

**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 INTERNATIONALES BÜRO  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/86, 7/01, 7/04, 5/10</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/01834</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 13. Januar 2000 (13.01.00)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/05542  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 1. September 1998 (01.09.98)   <b>(30) Prioritätsdaten:</b>            198 30 141.3      6. Juli 1998 (06.07.98)      DE   <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HEILBRONN, Regine [DE/DE];            Manteuffelstrasse 7, D-12203 Berlin (DE).   <b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHETTER, Christian            [DE/DE]; Overbergstrasse 19, D-40723 Hilden (DE).   <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,            D-81679 München (DE).         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, IL, JP, US, europäisches Patent            (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,            LU, MC, NL, PT, SE).   <b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> </td> </tr> </table>			<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/05542 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 1. September 1998 (01.09.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 30 141.3      6. Juli 1998 (06.07.98)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HEILBRONN, Regine [DE/DE]; Manteuffelstrasse 7, D-12203 Berlin (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHETTER, Christian [DE/DE]; Overbergstrasse 19, D-40723 Hilden (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/05542 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 1. September 1998 (01.09.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 30 141.3      6. Juli 1998 (06.07.98)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HEILBRONN, Regine [DE/DE]; Manteuffelstrasse 7, D-12203 Berlin (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHETTER, Christian [DE/DE]; Overbergstrasse 19, D-40723 Hilden (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>			
<b>(54) Title: RECOMBINANT HERPES VIRUSES FOR PREPARING RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES</b>  <b>(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE HERPESVIREN FÜR DIE ERZEUGUNG REKOMBINANTER ADENO-ASSOZIIERTER-VIREN</b>  <b>(57) Abstract</b>  <p>The invention relates to a recombinant herpes virus which contains the rep and cap genes of the adeno-associated virus, and to a method for producing high-titre, highly infectious adeno-associated virus vector preparations.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b>  <p>Es wird ein rekombinanter Herpesvirus beschrieben, der die rep- und cap-Gene von AAV umfaßt sowie ein Verfahren zur Herstellung von hochtitrigen, hochinfektösen Adeno-assoziierten Virus-Vektor-Präparationen.</p>				

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Rekombinante Herpesviren für die Erzeugung rekombinanter Adeno- assoziierter-Viren**

### **5 Beschreibung**

Die Erfindung betrifft einen rekombinanten Herpesvirus, ein Verfahren zur dessen Herstellung sowie ein Verfahren zur Herstellung von hochtitrigen, infektiösen Adeno-assoziierten Virus-Vektor-Präparationen.

10

Es sind zahlreiche genetische Erkrankungen bekannt, für die bisher keine wirksame Therapie gefunden wurde. Ein möglicher Weg zur Behandlung genetischer Erkrankungen besteht darin, ein bestimmtes Gen, welches die genetische Erkrankung korrigieren kann, in das Genom des Patienten einzubringen, so daß es in der DNA des Patienten vorliegt und sich dort replizieren kann.

15

Zum Einbringen des gewünschten korrigierenden Gens in die Zelle können Vektoren verwendet werden, wobei virale Vektoren auf der Basis von Adeno-assoziierten Viren (AAV) für die Gentherapie gegenüber anderen viralen Vektorsystemen eine Reihe von Vorteilen aufweisen. AAV ist ein sehr stabiles, aber apathogenes Virus. Zudem hat es einen breiten Gewebetropismus und die Fähigkeit zur effizienten chromosalen Integrationen sowohl in proliferierenden als auch in ruhenden Zellen.

20

Als virale Vektorsysteme werden zumeist AAV-Vektoren auf Basis des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 (AAV-2) eingesetzt (Carter, Curr. Opinion. Biotech. 3 (1992) 533; Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Imm. 158 (1992) 97). Bei AAV-2 handelt es sich um ein weit verbreitetes, humanes Virus, wobei bei der Primärinfektion, die zumeist im Kindesalter stattfindet, keine Pathogenität induziert wird. Es gibt auch keine Hinweise darauf, daß AAV-2 ein onkogenes Potential besitzen könnte. Aufgrund der hohen Stabilität von

25

30

AAV-2 kann das Virus auch aufwendige Reinigungsverfahren ohne Verlust an Infektiosität überstehen.

AAV-2 ist ein kleines, einzelsträngiges DNA-Virus, das zwei Gene trägt: Das  
5 rep-Gen kodiert für vier überlappende, regulatorische Proteine, Rep78 und  
Rep52 und C-terminal gepleißte Varianten der beiden Proteine, Rep68 und  
Rep40. Die Rep-Proteine dienen zur AAV-Genregulation, DNA-Replikation  
und Virusverpackung. Das cap-Gen kodiert für die drei Virus-Capsidproteine.  
Die beiden Gene rep und cap werden von 145 bp langen invertierten  
10 Reiterationen flankiert, die als "Origins of Replication" dienen. Diese sind die  
einzigen AAV DNA-Sequenzen, die in Cis für DNA-Replikation,  
Virusverpackung und Integration in Wirtszellgenom benötigt werden, so daß  
ca. 4,7 kb lange Fremdsequenzen in die jeweiligen Vektoren kloniert werden  
können.

15 AAV sind replikationsdefekt und benötigen für eine effiziente Vermehrung  
eine Coinfektion mit einem Helfervirus. Ohne Helferviren integriert AAV mit  
hoher Frequenz ins Wirtszellgenom, wobei ein spezifischer Locus auf  
Chromosom 19 (q13.3-qter) stark bevorzugt wird. Die Integration ist dabei  
20 unabhängig von der viralen oder zellulären DNA-Replikation. Aufgrund der  
genannten Vorzüge bieten AAV-Vektoren ideale Voraussetzungen für die  
Einschleusung und stabile Integration von Genen in nicht proliferierende  
Zellen. Für die Gentherapie werden üblicherweise rekombinante AAV-  
Vektoren eingesetzt, die eine heterologe, für ein gewünschtes Genprodukt  
25 kodierende DNA umfassen. Durch die Insertion der heterologen DNA in die  
AAV-Vektoren wird jedoch die rep und cap-Expression beeinträchtigt.  
Deshalb müssen zur Vermehrung der rekombinanten AAV-Vektoren diese  
Proteine bzw. Systeme, die diese Proteine exprimieren, von außen zugeführt  
werden.

30 Diese Vermehrung kann beispielsweise durch Cotransfektion von  
Adenovirus-infizierten Zellen mit dem rekombinanten AAV-Vektor und ein m

Helferplasmid erfolgen, im dem die rep- und cap-Gene von AAV durch die Replikationsursprünge ("Origins of Replication") von Adenovirus Typ 5 flankiert werden. Das Helferplasmid wird in den Adenovirus-infizierten Zellen repliziert, so daß ausreichende Mengen an Rep und Cap zur Propagation des AAV-Vektors zur Verfügung stehen. Das rep- und cap-exprimierende Konstrukt weist keine gemeinsamen DNA-Sequenzen mit dem AAV-Vektor auf, so daß kein die Vektorpräparation kontaminierendes Wildtyp AAV durch homologe Rekombination entstehen kann (Samulski et al., J. Virol. 63 (1989), 3822). Ein Nachteil dieses Systems ist jedoch, daß die erreichbaren Virustiter mit  $10^4$  bis  $10^6$  infektiösen Partikeln pro ml deutlich niedriger als bei Wildtyp-AAV sind, das bis zu  $10^{12}$  Partikel pro ml erreichen kann. Zudem müssen für jeden Ansatz aufs neue Zellen mit dem AAV-Vektor und dem rep- und cap-exprimierenden Helferplasmid cotransfiziert und anschließend mit Adenovirus infiziert werden, da das Helferplasmid nicht als Virus verpackt wird und somit nicht durch Infektion übertragen werden kann.

J. Conway et al. (J. Virol. 71 (11) (1997), 8780-8789) beschreiben ein Verfahren zur Replikation und Verpackung von rekombinantem AAV Typ 2 mittels eines Herpes Simplex Virus (HSV) Typ 1 Amplikons, das Rep und Cap exprimiert. Die HSV-Amplikons werden in HSV-Hüllen verpackt und können deshalb nur in Gegenwart von Wildtyp-HSV vermehrt werden. Das relative Verhältnis von Wildtyp HSV und verpackten Amplikons ist bei der gemeinsamen Vermehrung nicht vorhersehbar und auch kaum einstellbar. Es gibt auch keine Methode, die beiden Viruspopulationen durch Aufreinigung voneinander zu trennen, da die beiden gemeinsame Hülle die wesentlichen physiko-chemischen Eigenschaften ausmacht. Darüber hinaus besteht das Problem, daß das Amplikon aufgrund von Wachstumsnachteilen bereits nach wenigen Passagen nur noch in einer nicht mehr nachweisbar geringen Menge vorliegt. Das Amplikon-System ist deshalb nur reproduzierbar anwendbar, wenn man für jede rAAV-Präparation das Amplikon-Plasmid transfiziert und dann mit Wildtyp-HSV überinfiziert. Dies hat aber zur Folge, daß man für jede Vermehrungsrunde die Amplikon-

Plasmide erneut transfizieren muß, was aber genau der Nachteil des weiter oben beschriebenen Verpackungssystems ist.

Es wurde versucht, die mit der Verwendung von nicht selbstreplizierenden  
5 Plasmiden verbundene Nachteile durch Etablierung von stabilen Zelllinien zu lösen, die die AAV-Gene rep und cap in ausreichend hoher Menge exprimieren. Da Rep jedoch toxisch ist, bereitet die Bildung von stabilen Zellklonen, die funktionsfähiges Rep78 oder Rep68 exprimieren, große Schwierigkeiten.

10

In WO 95/06743 wird ein Verfahren zur Herstellung von rekombinantem AAV beschrieben, bei dem als Helfervirus ein Adenoviruskonstrukt verwendet wird, welches ein die rep- und cap-Gene von AAV aufweisendes rekombinantes Insert umfaßt. Die Expression von Rep-Proteinen in mit AAV  
15 infizierten Zellen hemmt jedoch die Adenovirusinfektion, so daß keine hochtitrigen Präparationen erhalten werden können. In WO 95/06743 wird auch die Verwendung eines Herpesvirusvektors anstelle des Adenovirusvektors vorgeschlagen. Allerdings wird keine nacharbeitbare Anleitung gegeben, auf welche Weise stabile rekombinante Herpesviren, die  
20 AAV-Genbereiche umfassen, hergestellt werden können, bei denen keine Reversion zum Wildtyp stattfindet.

Eine Aufgabe der Erfindung war es daher, ein System bereitzustellen, mit dem rekombinante AAV-Vektoren als hochtitrige Präparationen, wie sie für  
25 Anwendungen im klinischen Maßstab benötigt werden, hergestellt werden können. Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, ein Helferkonstrukt zur Vermehrung von AAV-Vektoren bereitzustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind.

30 Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch stabile Zelllinien gelöst, die die AAV-Gene rep und cap in ausreichend hoher Menge exprimieren, und in denen AAV-Vektoren durch Infektion propagiert werden können.

Die Erfindung betrifft ein rekombinantes Herpesvirus, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es ein rep- und ein cap-Gen von Adeno-assoziierten Viren (AAV), beispielsweise ein rep- und ein cap-Gen von AAV-2 oder ein damit funktionell äquivalentes Gen, in operativer Verknüpfung mit einer  
5 Expressionskontrollsequenz enthält. Vorzugsweise befinden sich das rep- und cap- Gen auf einer Insertion, die im Genom des Herpesvirus an einer geeigneten Stelle integriert ist.

Das erfindungsgemäße rekombinante Herpesvirus enthält zum einen die für  
10 die effiziente Vermehrung von AAV benötigten Helferfunktionen und kann daneben die für Rep und Cap kodierenden Bereiche von AAV in ausreichender Menge exprimieren, so daß eine Vermehrung und Verpackung von AAV-Vektoren in Zellkultur bei Coinfektion mit dem rekombinanten HSV (rHSV) möglich ist.

15 Als Expressionskontrollsequenzen sind alle Sequenzen geeignet, die zu einer ausreichenden Expression von rep und cap in der Zielzelle führen, beispielsweise homologe AAV-Expressionskontrollsequenzen, wie etwa der AAV p5 Promotor, oder heterologer Promotoren, z.B. eukaryontische  
20 zelluläre oder virale Promotoren. Es können konstitutive oder regulierbare Expressionskontrollsequenzen verwendet werden. Das rep- und das cap-Gen können unter gemeinsamer Kontrolle einer einzigen Expressionskontrollsequenz oder jeweils unter Kontrolle einer separaten - gleichen oder verschiedenen - Expressionskontrollsequenz stehen.

25 Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Herpesviren, insbesondere HSV, gegenüber einer hohen Expression der AAV-Rep-Proteine resistent sind. Durch Integration des rep- und des cap- Gens in ein Herpesvirus, welches ohnehin als Helfervirus für die Vermehrung der Helfervirus-abhängigen AAV-Vektoren erforderlich ist, konnte ein Konstrukt erhalten  
30 werden, welches alle zur AAV-Vermehrung benötigten Funktionen aufweist und eine Herstellung der für die Vektorpropagation benötigten AAV-Proteine

in großen Mengen ermöglicht. Mit einem solchen System können infektiöse AAV-Vektoren in großem Maßstab hergestellt werden, wie sie für die Gentherapie im klinischen Maßstab benötigt werden. Die Bildung von rekombinanten AAV ist somit nicht mehr, wie bei der Verwendung von Plasmiden, von Transfektionseffizienzen abhängig.

Das erfindungsgemäße Herpesvirus ist genetisch stabil und zeigt bevorzugt keine Reversion zum Wildtyp. So findet man auch nach mehreren aufeinander folgenden Verdünnungsschritten bei einer Plaque-Reinigung, z.B. nach 3, bevorzugt nach 5 und besonders bevorzugt nach 7 Verdünnungsschritten keine sichtbare Reversion zum Wildtyp, was zeigt, daß die integrierte Kasette stabil bleibt. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Herpesvirus ist, daß es mit einem hohen Titer kultiviert werden kann, z.B. mit einem Titer von  $\geq 5\%$ , insbesondere  $\geq 10\%$  und besonders bevorzugt  $\geq 20\%$  des Titors des entsprechenden Herpesvirus-Wildtyps, wobei der Titer dabei bevorzugt als Cell-Release-Virus (CRV)-Titer bestimmt wird.

Das erfindungsgemäße rekombinante Herpesvirus enthält weiterhin bevorzugt ein Reporter-gen, dessen Exprimierbarkeit in Assoziation mit der Integration des rep- und des cap-Gens steht. Das Reporter-gen steht in operativer Verknüpfung mit einer geeigneten Expressionskontrollsequenz, wie etwa einem SV40-Promotor oder einem anderen Promotor, z.B. einem HSV- oder AAV-Promotor. Bevorzugt ist das Reporter-gen ein Nichtantibiotikumresistenz-Gen, besonders bevorzugt ein für ein direkt, z. B. visuell nachweisbares Polypeptid, z.B. LacZ oder GFP (Green Fluorescence Protein) kodierendes Gen. Durch Expression des Reporter-gens kann die Reinheit von AAV-Präparationen, die das rekombinante Herpesvirus nicht mehr enthalten dürfen, überwacht werden. Weiterhin wird auch eine Kontrolle der Reinheit von rekombinanten Herpesviruspräparationen gegenüber Verunreinigungen mit Wildtyp-Herpesviren ermöglicht.



Grundsätzlich kann jedes Mitglied der Herpesvirusfamilie (Herpesviridae) durch Insertion eines rep- und eines cap-Gens von AAV in ein erfindungsgemäßes rekombinantes Herpesvirus überführt werden. Beispiele geeigneter Herpesviren sind das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Cytomegalovirus (CMV), das Pseudorabiesvirus (PRV) und das Epstein-Barrvirus (EBV). Besonders bevorzugt ist das Herpes-Simplex-Virus (HSV) und insbesondere HSV-Typ I. Günstigerweise wird ein Herpesvirus verwendet, welches eine singuläre Restriktionsstelle aufweist, z. B. die HSV-Typ I Mutante 1802 (Rixon et al., J. Gen. Virol. 71 (1990), 2934-2939), welche nur eine einzige XbaI-Stelle in der U<sub>S</sub>-Region an Position 143 969 (die Nummerierung der Positionen erfolgt gemäß McGeoch et al., Nucl. Acids Res. 14 (1986), 1727-1745) aufweist.

Das Herpesvirus kann das rep- und das cap-Gen von AAV in einer nichtessentiellen Region enthalten, z.B. in der U<sub>S</sub>- oder/und U<sub>L</sub>- Region. Bevorzugt ist auch die Verwendung replikationsdefizienter Herpesvirusmutanten. Hierzu kann man das rep- oder/und das cap-Gen in einen Bereich des Herpesvirusgenoms inserieren, der für die Replikation des Herpesvirus benötigt wird, nicht aber für die AAV-Replikation. Alternativ kann eine Herpesvirus-Mutante verwendet werden, in der schon von vorneherein das entsprechende Herpesvirus-Replikationsgen deletiert ist. In Frage kommt beispielsweise das UL9-Gen, das für die HSV-Replikation absolut essentiell, aber für die AAV-Replikation überflüssig ist (Weindler et al., J. Virol. 65 (1991), 2476-2483). Darüber hinaus ist auch das UL54-Gen geeignet, das für das Immediate Early Protein ICP27 kodiert. Auch dieses Gen wird nicht für die AAV-Replikation benötigt. Die Deletion des UL54-Gens führt zu einer Verlangsamung des Herpesvirus-Replikationszyklus, die entsprechende Mutante ist aber jedoch nicht komplett replikationsdefizient, im Gegensatz zu einer Mutation im UL9-Gen. Darüber hinaus kommen auch noch andere Herpesvirus-Gene für die Insertion in Frage, deren Mutation oder/und Deletion den gleichen Effekt hat, nämlich eine Verlangsamung bzw. eine vollständige Blockierung des Herpesvirus-Replikationszyklus.

Bevorzugt umfaßt das rekombinante Herpesvirus nicht die vollständige invertierte Repetitionsequenz (ITR) von AAV und besonders bevorzugt ist es vollständig frei von Anteilen der ITR-Sequenz von AAV.

5 Eine zusätzliche Verbesserung kann durch Verwendung regulierbarer Expressionskontrollsequenzen für das rep- oder/und das cap-Gen, insbesondere für das rep-Gen erzielt werden. Beispiele hierfür sind Expressionskontrollsequenzen, die durch Zugabe von Tetracyclin (Gossen und Bujard, Proc. Natl. Sci. USA (1992), 5547-5551) oder durch Zugabe  
10 von Ecdyson (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), 3346-3351) regulierbar sind. Alternativ können auch Promotoren verwendet werden, die die Expression von "early" und "late" Herpesvirusproteinen, z.B. von HSV steuern.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus, wobei man das rep- und das cap-Gen von AAV in das Genom eines Herpesvirus stabil integriert. Dazu wird die Herpesvirus-DNA bevorzugt an einer oder mehreren gewünschten Stellen gespalten und ein das rep- und das cap-Gen enthaltendes DNA-Fragment,  
20 z.B. ein Plasmid, in die Herpesvirus-DNA ligiert. Die Spaltung wird bevorzugt mit Restriktionsenzymen, beispielsweise mit XbaI, durchgeführt. Alternativ können die rep- und cap-Gene auch durch homologe Rekombination in das Herpesvirusgenom inseriert werden. Das rep-cap-Konstrukt muß dann flankierende Sequenzen aufweisen, die mit der für die Insertion ins  
25 Herpesvirusgenom vorgesehenen DNA-Sequenz übereinstimmen oder zumindest eine hohe Homologie aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Nukleinsäure, die aus einem erfindungsgemäßen rekombinanten Herpesvirus stammt und das rep- und  
30 das cap-Gen von Adeno-assoziierten Viren (AAV) sowie die von einem Herpesvirus stammenden, zur Vermehrung von rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren benötigten Helferfunktionen jeweils in operativer

Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen enthält. Diese Nukleinsäure befindet sich vorzugsweise auf einem Vektor, insbesondere auf einem eukaryontischen Vektor.

- 5 Die Erfindung umfaßt weiterhin eine Viren-Zusammensetzung, die den erfindungsgemäßen rekombinanten Herpesvirus enthält. Eine solche Zusammensetzung ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß sie frei von Wildtyp-Herpesvirus ist.
- 10 Unter dem Begriff Virus, wie er hierin verwendet wird, sind auch Virionen zu verstehen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Herpesviren und Vektoren werden vorteilhaft zur Herstellung von hochtitrigen, infektiösen rAAV-  
15 Vektorpräparationen verwendet. Deshalb umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung infektiöser AAV-Vektorpräparationen, welches die Schritte umfaßt:

- (a) Bereitstellen eines viralen Vektors auf der Basis von Adeno-  
20 assoziierten Viren (AAV), welcher eine heterologe DNA-Insertion umfaßt,
- (b) Bereitstellen eines rekombinanten Herpesvirus, das ein rep- und ein cap-Gen von AAV in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz enthält,
- 25 (c) Einbringen des AAV-Vektors aus (a) und des rekombinanten Herpesvirus aus (b) in eine Zelle, z.B. durch Infektion, oder/und DNA-Transfektion,
- (d) Vermehren des AAV-Vektors und
- (e) Gewinnen einer infektiösen AAV-Vektorpräparation.

30

Anstelle des rekombinanten Herpesvirus (bzw. Virions) kann auch ein entsprechender Vektor, welcher das rep- und das cap-Gen von AAV sowie

die zur Replikation und Verpackung von AAV notwendigen Helfer-funktionen enthält, eingesetzt werden.

Bevorzugt wird die Zelle mit dem rekombinanten AAV-Vektor transfiziert  
5 oder infiziert und anschließend mit dem rekombinanten Herpesvirus infiziert.  
Besonders bevorzugt werden sowohl der AAV-Vektor als auch das  
Herpesvirus durch Infektion in die Zelle eingebracht, da auf diese Weise das  
Auftreten einer unerwünschten illegitimen Rekombination weitestgehend  
unterdrückt werden kann. Für das erfindungsgemäße Verfahren kann ein  
10 replizierbares rekombinantes Herpesvirus verwendet werden. Bevorzugt wird  
jedoch ein nicht oder nur eingeschränkt replizierbares rekombinantes  
Herpesvirus eingesetzt, was zu einer weiteren Erhöhung der Ausbeute an  
AAV führt. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich,  
hochtitrige, infektiöse AAV Vektorpräparationen, insbesondere  
15 eingekapselte rAAV-Präparationen zu gewinnen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen rekombinanten Herpesvirus (Virions) oder  
Vektors, die die zur AAV-Vermehrung benötigten Helferfunktionen umfassen  
sowie eine ausreichende Menge von Rep und Cap Proteinen bereitstellen,  
20 können AAV-Vektoren durch Infektion von eukaryontischen Zellen  
einschließlich verschiedener, allgemein verfügbarer Zelllinien vermehrt  
werden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine Zelle, die  
einen erfindungsgemäßen rekombinanten Herpesvirus oder Vektor enthält.  
Die Zelle ist vorzugsweise eine Säugerzelle, insbesondere eine permanent  
25 kultivierbare Zelle. Beispiele sind Nagerzellen wie BHK-Zellen, z.B. BHK21.  
Es können aber auch andere Zellen, z.B. humane Zellen wie etwa Vero- oder  
HeLa-Zellen verwendet werden.

Die Zelle kann das Virus, den Vektor oder das Virion in extrachromosomaler  
30 Form in einer oder mehreren Kopien enthalten. Derartige Zellen sind  
beispielsweise durch Infektion erhältlich. Alternativ kann das Virus, der

- 11 -

Vektor oder das Virion auch im Genom der Zelle integriert vorliegen. Bevorzugt wird die Zelle durch Infektion mit dem Virus erzeugt.

5 Darüber hinaus kann die Zelle weiterhin einen rekombinanten AAV-Vektor, insbesondere einen AAV-Vektor mit einer heterologe DNA-Insertion, der für therapeutisch wirksames Polypeptid kodiert, enthalten. Der AAV-Vektor kann extrachromosomal oder integriert im Genom der Zelle latent vorliegen. Er wird dann bei Infektion mit rekombinanten Herpesvirus freigesetzt und repliziert dann wie nach einer AAV-Vektor-Infektion.

10

Die Infektion von Säugerzellen mit dem erfindungsgemäßen rekombinanten Herpesvirus ergab eine hohe Expression der rep- und cap-Gene, wobei die Ausbeuten einer Coinfektion mit AAV-Wildtyp und einem Herpes-Simplex Virus vergleichbar waren.

15

Schließlich betrifft die Erfindung noch ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von infektiösen AAV-Vektorpräparationen, bei dem gegenüber bekannten Verfahren, bei denen der AAV-Vektor durch Transfektion in eine Wirtszelle eingebracht wurde, eine signifikante Verringerung des Auftretens unerwünschter illegitimer Rekombinationen gefunden wird. Das Verfahren umfaßt das Einbringen eines AAV-Vektors und eines beliebigen Helfervirus, z.B. eines Adenovirus, eines Herpesvirus und insbesondere eines erfindungsgemäßen rep/cap exprimierenden Herpesvirus, in eine Zelle, die Kultivierung der Zelle unter geeigneten Bedingungen zur Vermehrung des AAV-Vektors und das Gewinnen einer infektiösen AAV-Vektorpräparation aus der Zelle oder/und dem Kulturüberstand, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß der AAV-Vektor und das Helfervirus beide durch Infektion in die Zelle eingebracht werden.

30

Die Erfindung wird durch die beigefügten Figuren und die folgenden Beispiele weiter erläutert.

- 5      Figur 1      zeigt die Genomstruktur eines erfindungsgemäßen rHSV/AAV. Die Position 143 969 der XbaI-Stelle in HSV-1 1802 ist gemäß der Nummerierung von McGeoch et al., Nucl. Acids Res. Nr. 14 (1986), 1727-1745). Die Nummerierung des AAV-Genoms erfolgt gemäß der Genbankhinterlegungsnummer J01901.
- 10      Figur 2      zeigt die Expression von AAV-Rep-Proteinen kurz (A) oder lange (B) nach einer Infektion von BHK-Zellen mit rHSV/AAV.
- 15      Figur 3      zeigt die Expression von AAV-Cap-Proteinen kurz (A) oder lange (B) nach einer Infektion von BHK-Zellen rHSV/AAV.
- 20      Figur 4      zeigt die Lokalisierung von Rep oder Cap Proteinen und assemblierten AAV Capsiden in rHSV/AAV-infizierten BHK-Zellen durch Immunofluoreszenz.
- 25      Figur 5      zeigt das Ergebnis eines Replikationscenterassays, in dem das herkömmliche und das erfindungsgemäße Verfahren verglichen werden.
- 30      Figur 6      zeigt das Ergebnis eines infektiösen Titerassays von rAAV/GFP in Rohlysaten.

## Beispiel

### 1. Material und Methoden

#### 5 1.1 Kultivierung von Zellen

BHK-21-Zellen (Stoker et al., Nature, 203 (1964), 1355-1357; ECACC Nr. 8501143) wurden als Monoschicht in G-MEM (Gibco BRL Nr. 21710-025) mit 10% NCS: (Newborn Calf Serum) (Gibco BRL-Nr. 16010-084), 1 x  
10 Tryptosephosphat-Bouillon (Gibco BRL-Nr. 18060-02) und Pen/Strep (Seromed) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gezüchtet. Um BHK-Zellen in Rollerflaschen (Falcon 850 cm<sup>3</sup>, Nr. 3027) zu kultivieren, wurde ein Volumen von 50 ml Medium verwendet und die Flaschen wurden mit 0,8 U/min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gedreht. Zur Infektion von in den Rollerflaschen wachsenden BHK-21-  
15 Zellen wurde das Volumen auf 15 ml komplettes G-MEM reduziert. BHK-21-Zellen wurden bis zu 15 Passagen vor dem Beginn einer neuen Kultur kultiviert.

HeLa- und Vero-Zellen wurden in D-MEM (Gibco Nr. 21855-025) mit 10%  
20 FCS (Seromede Nr. S0115) und Pen/Strep (Seromed) gezüchtet.

#### 1.2 Herstellung von infektiösen HSV und rHSV Präparationen

Wildtyp- oder rekombinante Herpes Simplex Viren (HSV) wurden durch  
25 Infektion von etwa  $2 \times 10^8$  BHK-21-Zellen, die in Rollerflaschen wie in Beispiel 1 beschrieben, gezüchtet wurden, in einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,002 vermehrt. Der Infektionsverlauf wurde durch die Zunahme des cytopathischen Effekts (CPE) in der Zellkultur überwacht. 3 Tage nach der Infektion zeigten die meisten Zellen einen vollständigen CPE und  
30 konnten durch Schütteln im Zellkulturmedium gesammelt werden.

Nach Zentrifugation bei 1500 x g für 10 min bei 4°C wurde Virus aus zellfreiem Überstand (CRV; Cell-Released-Virus) gewonnen, in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

- 5 Das Zellpellet wurde in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) resuspendiert und für 1 min bei 4°C beschallt. Nach Zentrifugation mit 2000 x g für 10 min bei 4°C) wurde der Überstand als zellassoziertes Virus (CAV) gewonnen, in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

### 10 1.3 Reinigung von HSV-Virionen

Zur Herstellung von HSV-Virionen wurden in Rollerflaschen kultivierte BHK-Zellen wie in 1.2 beschrieben infiziert. Nach Zentrifugation wurde der CRV-enthaltende klare Überstand in Zentrifugationsröhrchen überführt. Virionen  
15 wurden durch Zentrifugation für 2 h bei 4°C mit 23 000 x g pelletiert, was 13 500 U/min bei Verwendung eines Beckman SW28-Rotors entspricht. Das Viruspellet wurde in 1 ml MEM ohne Phenolrot (MEM-PR) resuspendiert und durch Beschallung bei 4°C (3 x für 30 sec) homogenisiert. Die Suspension wurde auf einen linearen Ficollgradienten (5% + 15% w/v in MEM-PR) in  
20 Beckman SW28 Ultraclear Röhrchen geschichtet und für 2 h bei 4°C mit 12 000 U/min (19 000 x g) zentrifugiert.

Bei Beleuchtung war die konzentrierte Virionen-Bande in der Mitte des Röhrchens sichtbar. Oberhalb der Virionen-Bande kann eine diffuse Bande  
25 sichtbar sein, welche beschädigte Partikel enthält. Die Virionen-Bande wurde durch Punktieren des Röhrchens mit einer 21 oder 23 Gauge-Nadel gesammelt, in ein neues Beckman SW28 Ultraclear Röhrchen überführt und mit MEM-PR auf ein Endvolumen von 35 ml verdünnt. Dann wurden die Virionen durch Zentrifugation für 2 h bei 4°C mit 22 200 U/min (65 000 x  
30 g) pelletiert. Das Pellet wurde in MEM-PR resuspendiert und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung von viraler DNA wurde das Pellet in 300 µl TE-



Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Röhrchen zur weiteren Verarbeitung überführt.

Alternativ wurden HSV-Virionen unter Verwendung eines CsCl-Gradienten aufgereinigt.

#### 1.4. Herstellung von HSV-DNA

Dem gemäß 1.3 gewonnenen, in 300  $\mu$ l TE resuspendierten Virionpellet wurden SDS (Endkonzentration von 0,2 %) und Proteinase K (Endkonzentration 300  $\mu$ g/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Natriumacetat pH 9,2, auf eine Endkonzentration von 0,3 M und einer Phenol/Chloroform-Extraktion (2 x Phenol/CIA (Chloroform-Isoamylalkohol), 1 x CIA), wurde die DNA durch Zentrifugation nach Zugabe von 2 Volumina Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE (Tris-EDTA-Puffer, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) resuspendiert.

#### 1.5 Herstellung des Plasmids psub201lac

Das auf pCH110 (Pharmacia) basierende Plasmid pFJ3, welches ein lacZ-Gen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors enthält (Rixon et al., J. Gen. Virol. 71 (1990) 2931-2939), wurde mit BamHI gespalten und dephosphoryliert. Das XbaI-Fragment von psub201 (Samulski et al., J. Virol. 61 (1987), 3096-3101), das die Sequenz 191-4485 des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 (Genbank Zugangs-Nr. J019901) einschließlich der rep- und der cap-Gene und der Promotoren p5, p19 und p40 aber ohne die Sequenzen der invertierten terminalen Repetitionen (ITR) enthält, wurde in pFJ3 inseriert, um psub201lac zu ergeben.

### 1.6 Plaqueassay

Subkonfluente BHK-21 Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen von HSV CRV oder CAV Präparationen infiziert. Nach 1 h Adsorption bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit G-MEM enthaltend 0,5% Sea Plaque-Agar, 5% NCS, Pen/Strep und 1 x Tryptose-Phosphat-Bouillon überschichtet. Nach Inkubation für 3 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wurden die Plaques gezählt und der Titer bestimmt.

### 10 1.7 X-Gal-Anfärbung

Infizierte oder nichtinfizierte Zellen wurden 1 x mit 150 mM NaCl, 15 mM Natriumphosphat, pH 7,3 in PBS gespült. Die Zellen wurden durch Inkubation für 5 min in kaltem PBS, enthaltend 2 % Formaldehyd und 0,2 % Glutaraldehyd fixiert. Um das Fixativ zu entfernen, wurden Zellen mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit der X-Gal-Anfärbelösung enthaltend 1 mg/ml X-Gal, 5 mM Kaliumferrocyanid, 5 mM Kaliumferricyanid, 2 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS überschichtet. Angefärbte Zellen wurden üblicherweise für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert, bis eine blaue Färbung sichtbar war.

### 1.8 Westernblot

Der Westernblot wurde, wie beim Laemmli, Nature, 227 (1970) 680-685 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, entweder während sie noch an die Platte anhafteten oder nachdem sie gesammelt und in einem 15 ml Röhrchen pelletiert waren. Nach Zugabe von 100 µl 1 x SDS Probenpuffer (50 mM Tris-Cl, pH 6,8; 1% β-Mercaptoethanol; 2% SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 10% Glycerin) pro 1 x 10<sup>5</sup> Zellen wurde die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden in kochendem Wasser für 10 min inkubiert, auf Eis gekühlt und bei -80°C gelagert. Zur Analyse wurden bis zu 30 µl jeder Probe auf ein

- 17 -

10% SDS Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) gegeben. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in einer Tris-Glycinlösung (25 mM Tris-Base; 95% mM Glycin; 10% Methanol) äquilibriert. Die Proteine wurden unter Verwendung einer halbtrockenen Blotvorrichtung und 1 mA/cm<sup>2</sup> auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, BA85, Nr. 401196) transferiert. Zur Kontrolle des Transfers und der Proteinmenge wurde die Membran mit Ponceau-S (Sigma) angefärbt. Die Membran wurde in PBS, 0,3% Tween-20, 10% fettfreiem Milchpulver für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert.

10 Antikörper wurden entsprechend in PBS, 0,3% Tween-20, 10% fettfreies Milchpulver verdünnt und für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Rep-Detektion wurden die monoklonalen Antikörper 303.9 und 76.3 (1:10 verdünnt) verwendet (Kleinschmidt et al. Virology 206 (1995) 254-262; Wistuba et al., J. Virol. 69 (1995), 5311-5319). Zur Detektion der Cap (VP)-Proteine wurde der Antikörper B1 (1:10 verdünnt) verwendet (Wistuba et al. (1995) supra). Die Filter wurden dreimal für 10 min mit PBS, 0,3% Tween-20 bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Detektion von AAV-Capsidstrukturen wurde der Antikörper A20 (Wistuba et al., J. Virol. 71 (1996), 1341-1352) verwendet.

Der zweite Antikörper, üblicherweise ein Anti-Maus-Antikörper-Peroxidase-Konjugat, wurde in PBS, 0,3% Tween-20, 10% fettfreiem Milchpulver verdünnt und zusammen mit dem Filter für 30 min bis 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die detektierten Proteine wurden über einen ECL-Kit gemäß Angaben des Herstellers (Amersham Life Science, RPN 2106) sichtbar gemacht.

### 1.9 Immunofluoreszenz

30 Zellen wurden auf Deckgläsern gezüchtet und mit HSV oder rHSV in einer MOI von 1 infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Deckgläser 3 x mit PBS

(Phosphat gepufferte Salzlösung) gewaschen, 5 min in eisgekühltem Methanol inkubiert und wiederum mit PBS gewaschen. Zum Blocken wurden die Deckgläser 30 min in PBS mit 10% NCS inkubiert. Dann erfolgte eine Inkubation für 1 h in einer Feuchtkammer mit den jeweiligen Detektions-  
5 Antikörpern (siehe 1.8), welche üblicherweise 1:1 in PBS mit 10% NCS verdünnt waren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser für weitere 30 min mit verdünntem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertem Anti-Mausantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser mit einem Fluoreszenz-  
10 mikroskop analysiert.

#### 1.10 Herstellung von rAAV

Für die Herstellung von rAAV Vektoren wurde das herkömmliche Verfahren  
15 (Cotransfektion) sowie das erfindungsgemäße rHSV/AAV-System verwendet. Die Experimente wurden mit BHK-21 Zellen durchgeführt, die entweder mit Wildtyp HSV Typ 1 Stamm 1802 oder mit dem erfindungsgemäßen rHSV/AAV infiziert wurden. Es wurde ein rAAV-GFP-  
(UF5) verwendet, der das Reporterprotein GFP (Green Fluorescence Protein)  
20 exprimiert (Zolotukhin et al., J. Virol. 70 (1996), 4646-4654). Die Plasmidpräparationen, die das rAAV Genom flankiert von den terminalen Repetitionseinheiten enthielten, wurden auf ihre Integrität hinsichtlich der terminalen Repetitionen überprüft, bevor sie in den Experimenten verwendet wurden.

25

BHK-21 Zellen, gezüchtet auf 5,5 cm Platten, wurden für das herkömmliche Verfahren mit 10 µg rAAV-GFP (UF5) Plasmid DNA und 10 µg ΔTR DNA (rep/cap-exprimierendes Plasmid) oder für das erfindungsgemäße Verfahren nur mit 10 µg rAAV-GFP (UF5) DNA transfiziert. Nach Inkubation über  
30 Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen zweimal mit serumfreien G-MEM und einmal mit PBS gewaschen, bevor komplettes G-MEM Medium zugegeben wurde. Dann wurden die Zellen 6 bis 12 h lang entweder mit

wtHSV-1 1802 in einer MOI von 1 (herkömmliches Verfahren) oder rHSV/AAV in MOIs von 0,01 bis 1 (erfindungsgemäßes Verfahren) infiziert. Nach Adsorption für eine Stunde bei 37°C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und komplettes G-MEM wurde zugegeben. Die infizierten  
5 Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, bis zu einem vollständigen CPE (üblicherweise 2 bis 3 Tage) inkubiert. Zur Ernte wurden die Platten bei -80°C eingefroren und nach Auftauen wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nach zwei weiteren Gefrierzyklen in flüssigem Stickstoff und Auftauen wurden die zellulären Trümmer durch Zentrifugation  
10 für 15 min bei 4°C mit 1500 x g entfernt. Der klare Überstand wurde als Rohlysate gesammelt und das Helfervirus wurde durch Inkubation bei 56°C für 15 bis 30 min inaktiviert. Das Lysat wurde direkt analysiert oder weiter auf einem CsCl-Gradienten gereinigt.

#### 15 1.11 Bestimmung der Anzahl an physikalischen rAAV Partikeln

Die Anzahl an physikalischen rAAV-Partikeln wurde durch eine Dot Blot-Analyse bestimmt. Zu 5 µl der rAAV enthaltenden Probe, erhalten aus einer CsCl-Gradientenfraction oder einem Rohlysate, wurden 20 µl 10 x DNase I-  
20 Reaktionspuffer (500 mM Tris-Cl, pH 7,5; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 µg/ml BSA), 5 µl DNase I (12 U) und 170 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 1 h wurden 200 µl 2 x Proteinase K-Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 20 mM EDTA, pH 8,0, 1% SDS) und 100 µg Proteinase K zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h bei 37°C wurde ein 1/10 Volumen 3 M  
25 Natriumacetat (pH 9,2) zugegeben und die Proben wurden einer Phenolextraktion (1 x Phenol, 1 Phenol/CIA, 1 x CIA) unterzogen. Nach Zugabe von 40 µg Glykogen und 2,5 Volumen 100% Ethanol wurde 30 min bei -80°C inkubiert. Schließlich wurde die DNA durch Zentrifugation für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Die Pellets wurden einmal  
30 mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 400 µl 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA-Lösung resuspendiert.

Als Standard wurden zweifache serielle Verdünnungen von rAAV Vektor DNA (40 bis 0,3 125 ng Plasmid) in einem Volumen von 20  $\mu$ l hergestellt und mit 0,4 NaOH, 10 mM EDTA-Lösung versetzt. Alle Proben wurden 5 Minuten bei 100 °C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Unter Verwendung einer Dot Blot-Vorrichtung wurden die Proben auf Gene Screen-Plus Membranen (NEN Light Science Products) überführt und die DNA wurde auf den Filtern durch UV-Licht vernetzt. Die Hybridisierung wurde gemäß Church et al., supra, bei 65°C in 0,25 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 1 mM EDTA, 7 % SDS und 1 % BSA durchgeführt. Nach 30 min bis 2 h einer Vorhybridisierung wurden die Membranen über Nacht an das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markierte 731 bp NotI-Fragment von rAAV-GFP hybridisiert. Die Filter wurden bei 65°C dreimal mit Waschpuffer I (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 2,5% SDS; 0,25% BSA; 1 mM EDTA) und weitere dreimal mit Waschpuffer II (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH, 7,2; 1% SDS, 1 mM EDTA) gewaschen. Nach Exposition der Filter auf Röntgenfilme wurden die Flecken ausgeschnitten und in einem Szintillationszähler analysiert. Die Anzahl an physikalischen Partikeln wurde unter Verwendung der doppelsträngigen rAAV-Plasmid DNA als Standard berechnet.

20

#### 1.12 Bestimmung des infektiösen Titors von rAAV-Präparationen durch einen den Replikationscenterassay

Zur Durchführung eines Replikationscenterassays wurden die Zellen geerntet, bevor rAAV aus der primär infizierten Zelle freigesetzt ist und eine Sekundärinfektion sich in der Kultur verbreitet. Etwa  $5 \times 10^4$  HeLa-Zellen wurden pro Vertiefung auf eine 12-Well-Platte gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen entweder mit Adenovirus (MOI = 20) alleine um wtAAV nachzuweisen oder mit Adenovirus (MOI = 20) und wtAAV (MOI = 4) um rAAV nachzuweisen, infiziert. Nach 1 h Adsorption wurden die Zellen gewaschen und mit 100  $\mu$ l rAAV-GFP enthaltendem Lysat infiziert. Nach 1 h wurde ein 1 ml frisches Medium zugegeben. Dann wurden die

30

Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert und durch Zentrifugation pelletiert. Noch haftende Zellen wurden trypsiniert und mit den pelletierten Zellen vereinigt. Die Zellen wurden resuspendiert und unter Verwendung einer Vakuumvorrichtung auf Nitrozellulosefilter übertragen. Die  
5 Hybridisierung der Nitrozellulosefilter wurde in einer Formamidlösung (5 x SSC; 50 % Formamid; 5 x Denhardt; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 0,1 % SDS; 0,1 mg/ml Hefe tRNA) bei 42°C entweder mit dem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markiertem 731 bp NotI-Fragment von rAAV-GFP oder dem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markierten 1465 bp-Fragment von AAV rep durchgeführt.

10

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Herstellung von rekombinantem HSV/AAV

15 Als Ausgangsmaterial wurde die HSV-Typ I Mutante 1082 (Rixon et al., J. Gen. Virol. 71 (1990) 2931-2939) verwendet, die nur eine einzige XbaI-Stelle in der U<sub>L</sub>-Region an Position 143 969 (Nummerierung gemäß McGeoch et al., supra) enthält. Diese Position ist zur Integration von heterologen Sequenzen geeignet, da zum einen keine offenen Leserahmen  
20 beeinflußt werden und zum anderen keines der 5 in diesem Bereich befindlichen Gene zur Virusvermehrung in Zellkultur essentiell ist. Die Vorgehensweise zur Herstellung von rHSV ist in Abb. 1 gezeigt.

psub201lac wurde mit XbaI gespalten, um die vollständige 8,4 kb lange  
25 Expressionskassette auszuschneiden. Anschließend wurde die gelgereinigte Expressionskassette in die XbaI-Stelle von HSV-1 1802 ligiert. Dazu wurde HSV DNA vollständig mit XbaI gespalten. 1 µg der XbaI-gespaltenen HSV DNA wurde mit 1 µg gereinigtem XbaI-Fragment von psub201lac in einem Volumen von 20 µl ligiert. Der ligierte HSV 1802/psub201lac wurde dann  
30 in BHK-21 Zellen unter Verwendung des folgenden Verfahrens transfiziert. 1 ml HBS, 1 µl Heringsperma DNA (10 µg/µl) und 10 µg ligierter HSV 1802/psub201lac (1 µg) wurden vermischt. Anschließend wurden 70 µl 2

M  $\text{CaCl}_2$  tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde nach Entfernen des Wachstumsmediums auf BHK-Zellen gegossen. Nach Inkubation für 40 min bei 37°C wurden 4 ml komplettes G-MEM (mit 5% NCS) zugegeben und die Zellen für weitere 200 min inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden  
5 die Zellen 1 mal mit Serumfreiem G-MEM gewaschen. Die transfizierten Zellen wurden dann mit 1 ml 20 % DMSO in HBS für 4 min bei Raumtemperatur behandelt. Die DMSO-Lösung wurde entfernt und die Zellen wiederum mit serumfreiem G-MEM gewaschen. Nach Zugabe von G-MEM mit 5% NCS wurden die Zellen 3 Tage gezüchtet, bis Plaques sichtbar  
10 waren und das Virus geerntet wurde. Die Gewinnung von CRV und CAV erfolgte wie in 1.2 beschrieben.

CAV-Plaquesassays wurden gemäß 1.6 durchgeführt. Die nach 3 Tagen sichtbaren Plaques wurden isoliert und in 200  $\mu\text{l}$  PBS mit 5% NCS  
15 überführt. Nach 3 Zyklen Ein- und Auftauen wurde die Suspension verwendet um Zellen zu infizieren, die dann auf die Anwesenheit des rekombinanten Herpes simplex Virus durch  $\beta$ -Gal-Anfärbung und Expression der Adeno-assoziierten Virusproteine Rep oder Cap analysiert wurden. Ein positiver Plaque wurde ausgewählt und durch weitere nachfolgende  
20 Plaqueassay-Runden gereinigt. Auch wenn ein homogenes und reines rekombinantes Isolat bereits nach Runde 4 erhalten wurde, wurden weitere Plaquereinigungsrunden durchgeführt, um selbst kleinste Verunreinigungen durch restlichen Wildtyp Herpes simplex Virus zu vermeiden. Alle positiven Plaques zeigten identische Muster an Rep oder Cap-Expression in der  
25 Westernblotanalyse.

Die Anwesenheit an Wildtyp HSV wurde durch Infektion verschieden großer Zellkulturschalen mit dem rekombinanten Virus und anschließendes das X-Gal Anfärben etwa 12 h p.i. untersucht. Dabei konnte keine Bildung von  
30 Wildtyp HSV angezeigt durch ungefärbte Bereiche infizierte Zellen beobachtet werden.



- 23 -

Das rekombinante HSV, hierin auch als rHSV/AAV bezeichnet, konnte in BHK-21 Rollerflaschen bis auf CRV-Titer von 1 bis  $2 \times 10^7$  PFU/ml gezüchtet werden, verglichen zu etwa  $1 \times 10^8$  PFU/ml, wenn Wildtyp HSV-1 1802 verwendet wurde. Die Reinheit aller rHSV/AAV-Präparationen wurde durch X-Gal-Anfärbung (siehe 1.7) analysiert. Auch bei Vermehrung von rHSV/AAV über mehrere Runden mit sehr geringen Infektionsmultiplizitäten wurde keine Reversion von rekombinantem HSV zu Wildtyp-HSV beobachtet. Unter diesen experimentellen Bedingungen würde evtl. vorhandenes Wildtyp-HSV das rHSV/AAV überwachsen, das - wie aus den obigen Titerangaben ersichtlich ist - geringfügige Wachstumsnachteile hat. Das isolierte rHSV/AAV ist dabei stabil und vermehrungsfähig. Aliquots der rHSV/AAV Präparationen wurden bei der European Collection of Cell Cultures CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 0IG, UK am 10. November 1997 hinterlegt und erhielten die vorläufige Zugangsnummer V97111302.

15

## **2.2 Expression von AAV Rep-Proteinen in mit rHSV/AAV infizierten BHK-Zellen**

Bereits bei der Analyse während der Plaquereinigung zeigte sich, daß AAV-Proteine nach Infektion von Zellen mit rHSV/AAV exprimiert werden. Zur genaueren Analyse des Zeitverlaufs und der Expressionshöhe wurden BHK-21 Zellen mit rHSV/AAV in einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 1 infiziert und bei den angegebenen Zeiten nach der Infektion geerntet. AAV Rep78 und Rep52 waren in BHK-21 Zellen bereits vier Stunden nach Infektion mit rHSV/AAV nachweisbar (Abb. 2A). Nach 8 h nach Infektion (8 h p.i.) waren alle vier Rep-Proteine sichtbar, wobei die Anteile vergleichbar einer Coinfektion von AAV Wildtyp und HSV-1 1802 waren. Die Expression der Rep-Proteine war sehr hoch und lag im Bereich einer produktiven Wildtyp-AAV Infektion in Gegenwart eines Helfervirus.

25  
30

Dieses Ergebnis zeigt, daß die integrierte AAV Sequenz, die die authentischen AAV Promotoren enthält, durch die HSV-spezifischen

Proteine wie ein nichtintegriertes Wildtypgenom nach Coinfektion mit einem Helfervirus reguliert wird. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, daß ein produktiver HSV Lebenszyklus selbst durch einen sehr hohen Gehalt an Rep-Proteinen nicht signifikant inhibiert wird.

5

Da eine Infektion mit HSV sehr schnell den Wirtszellenmetabolismus übernimmt und schließlich die Zelle lysiert, wurde die Gegenwart von Rep-Proteinen in einem späten Stadium der Infektion untersucht. Das Ergebnis (Abb. 2B) zeigt an, daß die Expression von Rep-Proteinen zwischen 16 bis  
10 24 h p.i. ein Plateau erreicht und Rep selbst in einem sehr späten Stadium (72 h ) nach Infektion noch nachweisbar sind.

### 2.3 Expression von Cap-Proteinen

15 Zur effizienten Verpackung ist eine hohe Expression der Adeno-assoziierten Cap-Proteine erforderlich. Deshalb wurde der Zeitverlauf der AAV Cap-Expression in BHK-21 Zellen nach Infektion mit rHSV/AAV analysiert (Abb. 3). Das AAV VP3 Protein war bereits 0 h nach Infektion detektierbar (Abb. 3A), so daß es in das rHSV/AAV-Virion eingebaut werden kann. Zwischen  
20 6 bis 8 h p.i. wurde eine Akkumulierung AAV VP Proteine gefunden, wobei die Mengen an VP1, VP2 und VP3 von einer Wildtyp AAV Infektion in Gegenwart von HSV-1 12 h nach Infektion nicht unterscheidbar waren (Abb. 3A). Dabei wurde eine entsprechende Expression der AAV VP Proteine erst initiiert, wenn ausreichende Gehalte an Rep-Proteinen,  
25 insbesondere Rep78 und Rep52 in den infizierten Zellen vorliegen (Abb. 2A). Die Expression der VP Proteine war von der Infektion bis zu 72 h nach Infektion hoch (Abb. 3B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß nach Infektion von BHK-  
30 21 Zellen mit rHSV/AAV hohe Mengen der VP-Proteine vorliegen, die in den Anteilen vergleichbar mit einer Coinfektion von Wildtyp AAV und HSV-1 sind.

Es wurde auch eine Expression der AAV-Proteine Cap und Rep in mit rHSV/AAV infizierten HeLa- oder Verozellen gefunden.

#### 2.4 Nachweis von AAV Capsidstrukturen

5

Es wurde durch Immunofluoreszenzanalyse untersucht, ob die Expression der AAV Cap-Proteine VP1, VP2 und VP3 zur Verpackung ausreicht. Unter Verwendung eines Rep-spezifischen Antikörpers (1.8) wurde eine intensive nukleäre und zytoplasmatische Anfärbung von rHSV/AAV infizierten BHK-21 Zellen beobachtet (Abb. 4). Unter Verwendung eines Cap-spezifischen Antikörpers (1.8) wurde ein ähnliches Anfärbungsmuster mit etwas geringeren Intensitäten gefunden (Abb. 4). Auch mit dem AAV-Capsid-spezifischen Antikörper A20 (1.8) konnten positive Signale in rHSV/AAV-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4).

15

#### 2.5 Verpackung von rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren mittels rHSV/AAV

Rekombinantes HSV/AAV unterstützt die Replikation und Verpackung von rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren, was unter Verwendung von lacZ- oder GFP-transduzierenden Adeno-assoziierten Vektoren gezeigt wurde.

Zur Bestimmung der tatsächlichen Zahl von Partikeln wurden BHK-21- oder Vero-Zellen mit rAAV-GFP (UF5) oder rAAV-GFP und  $\Delta$ TR transfiziert und anschließend entweder mit rHSV/AAV oder HSV-1 1802 wie oben beschrieben, infiziert. Die Partikelzahl im Rohlysate wurde durch Dot blot bestimmt. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen rHSV/AAV wurden  $1 \times 10^4$  rAAV-GFP-Partikel/Zelle gebildet verglichen mit  $8 \times 10^3$  Partikel/Zelle unter Verwendung des herkömmlichen Verfahrens.

Dazu wurden 14 cm Kulturschalen mit 100  $\mu$ g UF5 oder 50  $\mu$ g von jeweils UF5 und  $\Delta$ TR transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder mit den rekombinanten HSV/AAV oder der HSV-1 Variante 1802 in einer MOI von 1 infiziert. Lysate wurden drei Tage p.i. hergestellt und auf die Zahl an physikalischen rAAV-GVP-Partikel analysiert. Die Membran wurde auf das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP-markierte 731 bp NotI-Fragment von rAAV-GFP in einem Hybridisierungspuffer (Church et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81, (1984) 1991-1995) hybridisiert und bei 65°C inkubiert. Nach Waschen wurde der Filter freigelegt und die Flecken wurden ausgeschnitten. Die Flecken wurden in einem Packard Szintillationszähler gezählt und die Anzahl an Partikeln wurde unter Verwendung der Standards berechnet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 1

Probe	Anzahl an Zellen	Anzahl rAAV Partikel	rAAV Partikel/Zelle
BHK x UF5 inf. rHSV/AAV	$4 \times 10^7$	$4 \times 10^{11}$	$1 \times 10^4$
BHK x UF5/ $\Delta$ TR inf. HSV-1	$4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^{11}$	$8 \times 10^3$
Vero x UF5 inf. rHSV/AAV	$3 \times 10^7$	$9,5 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^3$
Vero x UF5/ $\Delta$ TR inf. HSV-1	$3 \times 10^7$	$4 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^4$

## 2.5 Reinheit und Stabilität der rHSV/AAV-Präparation

Die Bildung von Wildtyp AAV (wt AAV) während einer AAV-Vektorproduktion ist nicht unüblich (siehe z.B. Muzyczka, Curr. Topics. Microbiol. Immunol. 158 (1992) 97-129) und muß deshalb beim Verpacken sorgfältig überprüft werden. Insbesondere wenn die Herstellung eines Vektors in großem Maßstab angestrebt wird, muß die Bildung von Wildtyp AAV begründet und kontrolliert werden. Die in rHSV/AAV integrierten AAV

- 27 -

Sequenzen waren derart aufgebaut, daß sie frei von Sequenzelementen der invertierten terminalen Repetitionen (ITR) waren. Als Folge davon gibt es keine Sequenzüberlappungen zwischen rHSV/AAV und dem verwendeten AAV-GFP (UF5) was die Wahrscheinlichkeit eines Rekombinationsereignisses minimiert, das zur Bildung von wtAAV führen könnte. Um auszuschließen, daß wtAAV durch andere Prozesse, z.B. nichthomologe Rekombination gebildet wird, wurde ein rohes Verpackungslysate für infektiöses rAAV-GFP und wtAAV in einem Replikationscenterassay analysiert. Im Gegensatz zum Dotblot, der physikalische Partikel mißt, zeigt der Replikationscenterassay nur die infektiösen und vermehrungsfähigen Partikel.

Zwei verschiedene Konzentrationen von UF5 (10 µg oder 20 µg) oder 10 µg von jeweils UF5 und ΔTR wurden in  $4 \times 10^5$  HeLa-Zellen unter Verwendung der Ca-Phosphat-Methode transfiziert. Etwa 20 h nach Transfektion wurden die Zellen mit rHSV in einer MOI von 1 (für UF5 allein) oder Adenovirus mit einer MOI von 3 (für UF5/ΔTR) infiziert. Die Zellen wurden 40 h p.i. geerntet und 3 Einfrier-/Auftau-Zyklen unterworfen. Nach 30 min Inkubation bei 56°C (zur Inaktivierung des Helfervirus) wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert und der klare Überstand wurde gesammelt. Um den Replikationscenterassay durchzuführen wurden in 12-Well-Platten gezüchtete HeLa-Zellen nur mit Adenovirus (MOI = 20) oder mit Adenovirus (MOI = 20) und wtAAV (MOI = 4) infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl von jedem der zuvor hergestellten Rohlysate infiziert. Die Zellen wurden 24 h später geerntet, resuspendiert und mittels einer Vakuumvorrichtung auf Nitrozellulosemembranen überführt. Die Filter wurden mit einer gfp-spezifischen Sonde hybridisiert, um rAAV-infizierte Zellen nachzuweisen, und parallel mit einer rep-spezifischen Sonde, um Zellen sichtbar zu machen, die durch neu gebildetes wtAAV infiziert waren.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Verwendung rHSV/AAV zusammen mit UF5 ausreichend ist, um rekombinante AAV-Vektoren zu bilden, die für eine

Infektion ähnlich der herkömmlichen Cotransfektion von UF5 und  $\Delta$ TR infiziert mit Adenovirus kompetent sind (Abb. 5). Die Verwendung von entweder Adenovirus- oder Adenovirus- und wtAAV-infizierten HeLa-Zellen zeigt die Bildung von Wildtyp AAV an. In diesem Experiment war die  
5 Bildung wtAAV unter Verwendung des herkömmlichen Verfahrens sehr hoch. Im Gegensatz dazu wurden durch den neuen rHSV/AAV-Ansatz praktisch keine wtAAV-Partikel gebildet, wie durch Hybridisierung an die rep-spezifische Sonde angezeigt. Dies wurde auch durch Southern Blot-Analyse bestätigt, wobei in verschiedene Verpackungspräparationen keine  
10 replikativen Formen von wtAAV gefunden wurden.

## 2.7 Herstellung infektiöser rAAV-GFP-Partikel durch Infektion mit rHSV/AAV

15 Es wurde der Titer an infektiösen rAAV-GFP Partikeln bestimmt. Üblicherweise ist dieser etwa  $1 \times 10^3$  niedriger als die Anzahl an physikalischen Partikeln. Rohlysate aus Ca-Phosphat-transfizierten BHK-21-Zellen wurden hierzu unter Verwendung des infektiösen Titerassays in 96-Well-Platten analysiert.

20 Zur Bestimmung der infektiösen Titer von wtAAV oder rAAV wurden HeLa-Zellen in 96-Well-Platten mit einem Volumen von 90  $\mu$ l/Well gegeben. 10  $\mu$ l der AAV enthaltenden Präparation wurden den Vertiefungen der ersten Reihe zugegeben, vermischt und seriell 10fach für jeden der folgenden sieben  
25 Schritte verdünnt. Nach Inkubation für 12 bis 24 h wurden die transfizierten Zellen mit Adenovirus (MOI = 10-20) alleine infiziert, um auf wtAAV zu analysieren oder mit Adenovirus (MOI = 10-20) und wtAAV (MOI = 4), wenn der rAAV-Titer bestimmt wird. Wenn die Zellen ein vollständiges CPE zeigten, wurden sie dreimal eingefroren und aufgetaut. Die infektiösen  
30 Zelllysate wurden auf eine Gene Screen® Membran übertragen. Nach Denaturieren der Membran für 5 min auf einer feuchten Schicht von Whatman-Papier, getränkt in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl und Neutralisieren

durch Inkubation in 20 X SSC/0,5 M Tris, pH 7,5 für 5 min wurde die DNA auf der Membran UV-vernetzt. Die Membranen wurden zur Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde gemäß Church et al., supra, verwendet und es wurde der rAAV oder wtAAV Titer berechnet.

5

Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt und in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

	<b>Methode</b>	<b>10 µg UF5, rHSV/AAV MOI = 1</b>	<b>10 µg UF5, rHSV/AAV MOI = 0,1</b>	<b>10 µg UF5, rHSV/AAV MOI = 0,01</b>
10	inf. rAAV/ml	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$

	<b>Methode</b>	<b>20 µg UF5, rHSV/AAV MOI = 1</b>	<b>20 µg UF5, rHSV/AAV MOI = 0,1</b>	<b>20 µg UF5, rHSV/AAV MOI = 0,01</b>	<b>10 µg UF5/10 µg ΔTR, HSV-1 1802 MOI = 1</b>
	inf.rAAV/ml	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$

### Ansprüche

1. Rekombinantes Herpesvirus,  
5 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß es ein rep- und ein cap-Gen von Adeno-assoziierten Viren (AAV)  
in operativer Verküpfung mit einer Expressionskontrollsequenz  
enthält.
- 10 2. Rekombinantes Herpesvirus nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es keine Reversion zum Wildtyp zeigt.
3. Rekombinantes Herpesvirus nach Anspruch 1 oder 2,  
15 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß es weiterhin ein Reportergen umfaßt.
4. Rekombinantes Herpesvirus nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche,  
20 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß es ausgewählt ist aus der Gruppe der Herpesviridae umfassend  
Herpes-Simplex-Virus (HSV), Cytomegalovirus (CMV),  
Pseudorabiesvirus (PRV) und Epstein-Barr-Virus (EBV) und andere  
Mitglieder der Herpesvirusfamilie.  
25
5. Rekombinantes Herpesvirus nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es ein Herpes-Simplex-Virus (HSV) ist.
- 30 6. Rekombinantes Herpesvirus nach Anspruch 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es sich um die HSV-1 Mutante 1802 handelt.



7. Rekombinantes Herpesvirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es sich um eine vollständig oder teilweise replikationsdefiziente Mutante handelt.
8. Rekombinantes Herpesvirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertion nicht die vollständige ITR-Sequenz von AAV umfaßt.
9. Rekombinantes Herpesvirus nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das rep- und das cap- Gen von AAV in der  $U_L$  oder der  $U_S$ -Region des Herpesvirus inseriert sind.
10. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Herpesvirus nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man das rep- und das cap-Gen von AAV in das Genom eines Herpesvirus stabil integriert.
11. Verfahren nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das rep- und das cap- Gen durch Restriktionsspaltung/Ligation oder durch homologe Rekombination in das Herpesvirus-Genom integriert werden.

- 32 -

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß eine HSV-Mutante verwendet wird, die eine singuläre  
Restriktionsstelle aufweist.
- 5
13. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß eine vollständig oder teilweise replikationsdefiziente HSV-  
Mutante verwendet wird.
- 10
14. Nukleinsäure umfassend die zur Replikation von AAV-Viren  
erforderlichen Helferfunktionen eines Herpesvirusgenoms und darin  
insertiert ein rep- und ein cap-Gen von Adeno-assoziierten Viren  
(AAV) jeweils in operativer Verknüpfung einer  
15 Expressionskontrollsequenz.
- 15.
15. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er eine Nukleinsäure nach Anspruch 14 umfaßt.
- 20
16. Virale Zusammensetzung umfassend ein rekombinantes Herpesvirus  
nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16,  
25 dadurch gekennzeichnet,  
daß sie frei von Wildtyp-Herpesvirus ist.
18. Verfahren zur Herstellung von infektiösen AAV-Vektorpräparationen  
umfassend die Schritte:
- 30 (a) Bereitstellen eines viralen Vektors auf Basis von Adeno-  
assoziierten Viren (AAV),

- 33 -

- (b) Bereitstellen eines rekombinanten Herpesvirus nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
- (c) Einbringen des AAV-Vektors von (a) und des rekombinanten Herpesvirus von (b) in eine Zelle,
- 5 (d) Vermehren des AAV-Vektors und
- (e) Gewinnen einer infektiösen AAV-Vektorpräparation.
19. Verfahren nach Anspruch 18,  
dadurch gekennzeichnet,
- 10 daß der AAV-Vektor und der rekombinante Herpesvirus durch Infektion in die Zelle eingebracht werden.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19,  
dadurch gekennzeichnet,
- 15 daß man eine eingekapselte rAAV-Präparation gewinnt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß ein replizierbares rekombinantes Herpesvirus verwendet wird.
- 20
22. Verfahren nach Anspruch 18 bis 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß ein nichtreplizierbares rekombinantes Herpesvirus verwendet wird.
- 25
23. Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie ein rekombinantes Herpesvirus nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder einen Vektor nach Anspruch 15 enthält.

30

- 34 -

24. Zelle nach Anspruch 23,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das rekombinante Herpesvirus oder der Vektor durch Infektion  
eingeführt worden ist.
- 5 25. Zelle nach Anspruch 23 oder 24,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin einen rekombinanten AAV-Vektor enthält.
- 10 26. Zelle nach Anspruch 25,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß der AAV-Vektor eine heterologe DNA-Insertion enthält, die für  
ein therapeutisch wirksames Polypeptid kodiert.
- 15 27. Zelle nach einem der Ansprüche 23 bis 26,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es sich um eine BHK-, Vero- oder HeLa-Zelle handelt.
- 20 28. Verfahren zur Herstellung von infektiösen AAV-Vektorpräparationen,  
wobei ein AAV-Vektor und ein Helfervirus in eine Zelle eingebracht  
werden, der AAV-Vektor vermehrt und eine infektiöse AAV-  
Vektorpräparation aus der Zelle oder/und dem Kulturüberstand  
gewonnen wird,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
25 daß der AAV-Vektor und das Helfervirus durch Infektion in die Zelle  
eingebracht werden.

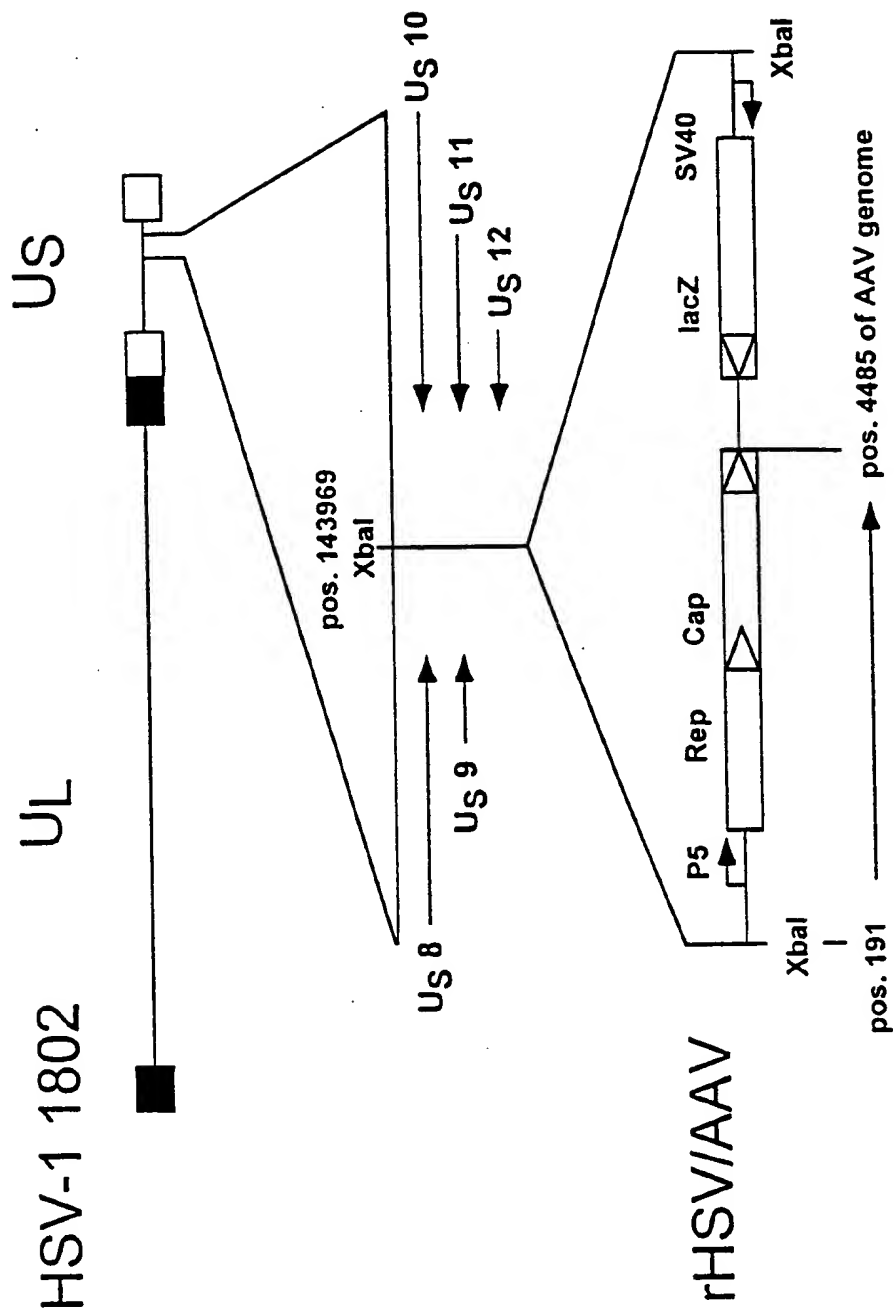


Abbildung 1

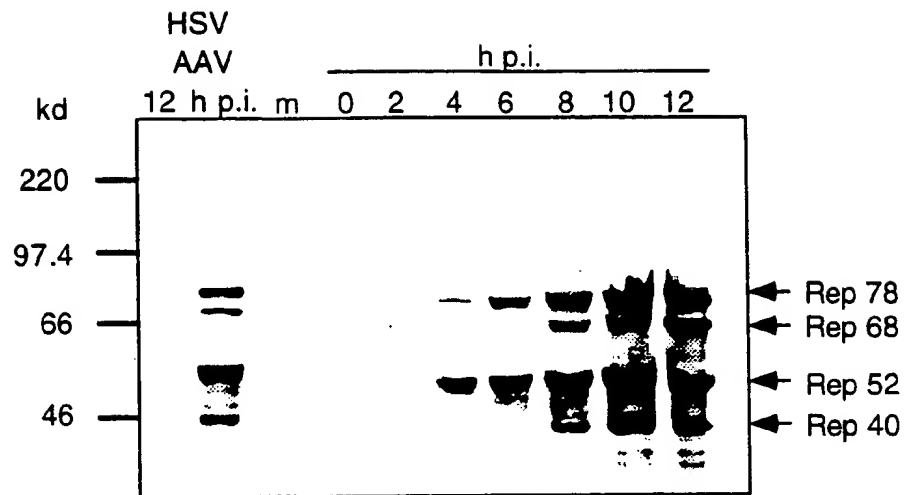
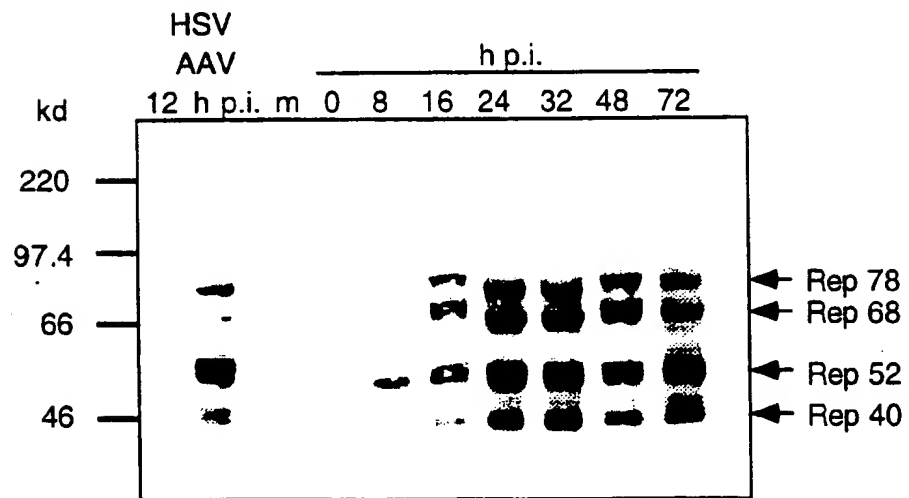
**A.****B.**

Abbildung 2

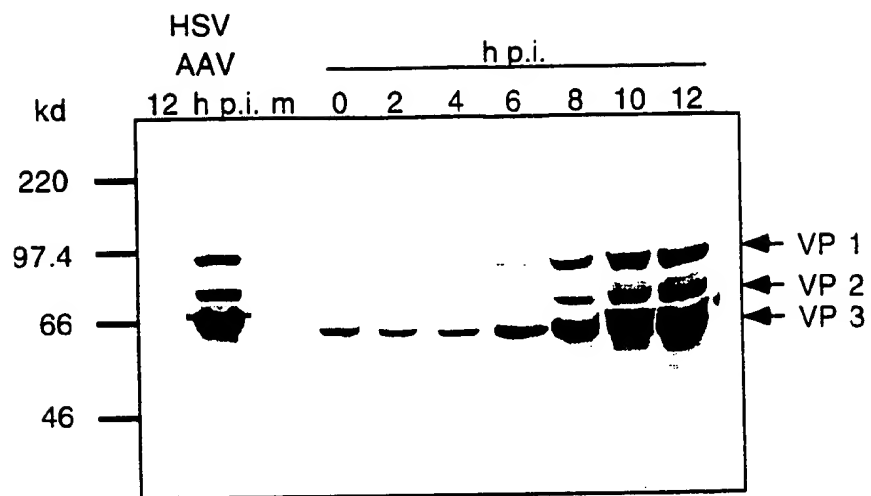
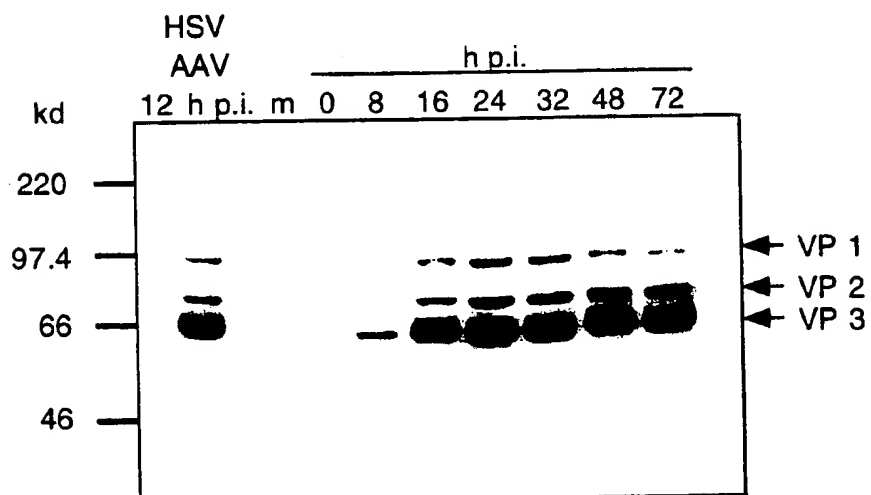
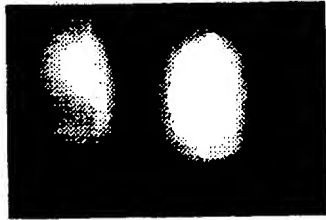
**B.**

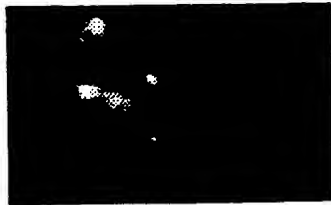
Abbildung 3



Rep-Antikörper (76.3)



Cap-Antikörper (B1)



Capsid-Antikörper (A20)

Abbildung 4



Abbildung 5

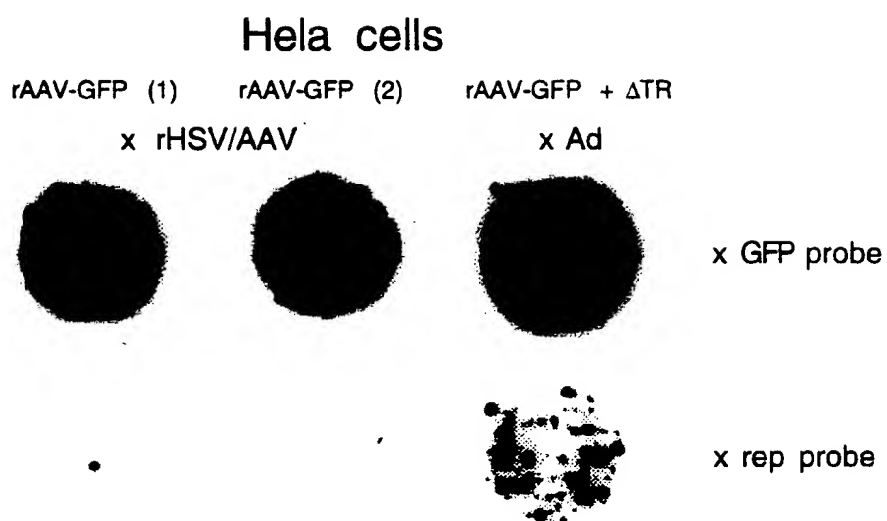
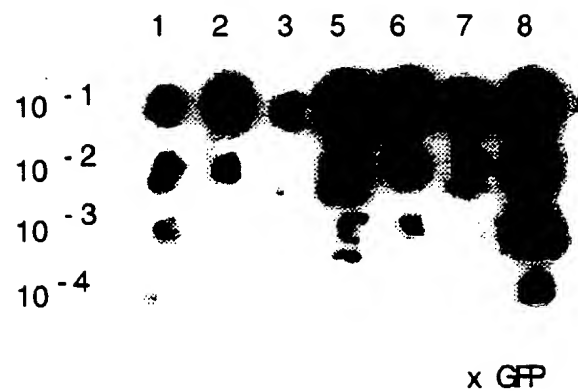


Abbildung 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 98/05542

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 C12N7/04 C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 06743 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 March 1995 cited in the application see abstract; claims 1,5,7,15,19,23,30,35; examples VI,VII see page 6, line 4 - page 7, line 20 see page 10, line 20 - page 11, line 30 see page 12, line 29 - page 13, line 13 see page 15, line 18 - line 28 ---	1,2,4,5, 7,9-21, 23-28
X	WO 95 20671 A (RHONE POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3 August 1995  see abstract; claims 1,4,15 see page 3, line 25 - line 30 see page 7, line 17 - line 24 ---	1,4,7,8, 10, 14-16, 18,22, 23,25,28
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10 May 1999</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">28/05/1999</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Ceder, O</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05542

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RIXON F J AND MCLAUCHLAN: "Insertion of DNA sequences at a unique restriction enzyme site engineered for vector purposes into the genome of herpes simplex virus type 1"</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 113, no. 71, 1 January 1990, page 2931 2939 XP002079295</p> <p>cited in the application</p> <p>see abstract</p> <p>see page 2932, left-hand column</p> <p>see page 2935, left-hand column</p> <p>---</p>	3,6,12, 27
A	<p>SRIVASTAVA A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND ORGANIZATION OF THE ADENO-ASSOCIATED VIRUS 2 GENOME"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 45, no. 2, 1 February 1983, pages 555-564, XP002058633</p> <p>cited in the application</p> <p>---</p>	
A	<p>CONWAY ET AL.: "Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by herpes simplex virus type 1 amplicon expressing rep and cap"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 11, November 1997, pages 8780-8789, XP002102271</p> <p>cited in the application</p> <p>see abstract</p> <p>-----</p>	1,4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. at Application No

PCT/EP 98/05542

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9506743 A	09-03-1995	AU 7565694 A	22-03-1995
WO 9520671 A	03-08-1995	FR 2716682 A	01-09-1995
		AU 1539595 A	15-08-1995
		CA 2181602 A	03-08-1995
		EP 0741793 A	13-11-1996
		FI 962990 A	26-07-1996
		JP 9509051 T	16-09-1997
		NO 962950 A	12-07-1996
		US 5789390 A	04-08-1998
		ZA 9500628 A	23-10-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05542

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/86 C12N7/01 C12N7/04 C12N5/10

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 95 06743 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9. März 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Ansprüche 1,5,7,15,19,23,30,35; Beispiele VI,VII siehe Seite 6, Zeile 4 - Seite 7, Zeile 20 siehe Seite 10, Zeile 20 - Seite 11, Zeile 30 siehe Seite 12, Zeile 29 - Seite 13, Zeile 13 siehe Seite 15, Zeile 18 - Zeile 28</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1,2,4,5, 7,9-21, 23-28</p>



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Mai 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/05/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ceder, O

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05542

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 95 20671 A (RHONE POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3. August 1995</p> <p>siehe Zusammenfassung; Ansprüche 1,4,15  siehe Seite 3, Zeile 25 - Zeile 30  siehe Seite 7, Zeile 17 - Zeile 24</p> <p>---</p>	<p>1,4,7,8,  10,  14-16,  18,22;  23,25,28</p>
A	<p>RIXON F J AND MCLAUCHLAN: "Insertion of DNA sequences at a unique restriction enzyme site engineered for vector purposes into the genome of herpes simplex virus type 1"</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,  Bd. 113, Nr. 71, 1. Januar 1990, Seite 2931 2939 XP002079295  in der Anmeldung erwähnt  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 2932, linke Spalte  siehe Seite 2935, linke Spalte</p> <p>---</p>	<p>3,6,12,  27</p>
A	<p>SRIVASTAVA A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND ORGANIZATION OF THE ADENO-ASSOCIATED VIRUS 2 GENOME"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY,  Bd. 45, Nr. 2, 1. Februar 1983, Seiten 555-564, XP002058633  in der Anmeldung erwähnt</p> <p>---</p>	
A	<p>CONWAY ET AL.: "Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by herpes simplex virus type 1 amplicon expressing rep and cap"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY,  Bd. 71, Nr. 11, November 1997, Seiten 8780-8789, XP002102271  in der Anmeldung erwähnt  siehe Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	<p>1,4</p>

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: 1105 Aktenzeichen

PCT/EP 98/05542

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9506743 A	09-03-1995	AU 7565694 A	22-03-1995
WO 9520671 A	03-08-1995	FR 2716682 A	01-09-1995
		AU 1539595 A	15-08-1995
		CA 2181602 A	03-08-1995
		EP 0741793 A	13-11-1996
		FI 962990 A	26-07-1996
		JP 9509051 T	16-09-1997
		NO 962950 A	12-07-1996
		US 5789390 A	04-08-1998
		ZA 9500628 A	23-10-1995